



REG-14599702

VAUZGE

NLM -- W1 BI668 (Gen); Film S00499

US PATENT AND TRADEMARK OFFICE
SCIENTIFIC AND TECHNICAL INFO CTR
107 S. WEST STREET, PMB 803
ALEXANDRIA, VA 22314

ATTN:	SUBMITTED:	2009-01-21 16:26:16
PHONE: 571-272-2517	PRINTED:	2009-01-22 09:33:00
FAX: 571-272-0230	REQUEST NO.:	REG-14599702
E-MAIL: STIC-DOCS@uspto.gov	SENT VIA:	DOCLINE
	DOCLINE NO.:	26355831

REG	Copy	Journal
TITLE:	BIOKHIMIYA (MOSCOW, RUSSIA)	
PUBLISHER/PLACE:	Obedinennoe nauchno-tekhnicheskoe izd- [Moskva]	
	:	
VOLUME/ISSUE/PAGES:	1988;53(10):1667-76 1667-76	
DATE:	1988	
ISSN:	0320-9725	
OTHER NUMBERS/LETTERS:	Unique ID.: 0372667	
	26355831	
SOURCE:	Unique Key	
MAX COST:	\$4.00	
COPYRIGHT COMP.:	Guidelines	
CALL NUMBER:	W1 BI668 (Gen); Film S00499	
REQUESTER INFO:	676360	
DELIVERY:	E-mail Post to Web: STIC-DOCS@uspto.gov	
REPLY:	Mail:	

KEEP THIS RECEIPT TO RECONCILE WITH BILLING STATEMENT

For problems or questions, contact NLM at http://wwwcf.nlm.nih.gov/ill/ill_web_form.cfm or phone 301-496-5511.

Include LIBID and request number.

NOTE:-THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY COPYRIGHT LAW (TITLE 17, U.S. CODE)

свойства рутина в комплексе со-
ерждают возможность ингибиро-
ния генерирования $O_2^{\cdot -}$.

ито антиоксидантные свойства ру-
тировать ионы железа с образова-
тельностью непосредственно взаимо-
ислорода. Вклад каждого из ме-
нной среды. На основании этих
менение высоких доз нетоксично-
ий терапевтический эффект при
зникающими на основе свободной
ции этих процессов ионами же-

дарность В. З. Ланкину за любез-
лецитина.

РА

2. № 7. P. 1141—1148.
83. V. 10. № 1. P. 47—55.
ood Agric. 1980. V. 31. № 7. P. 646—650.
43. № 3. P. 240—244.
0. V. 22. № 3. P. 253—260.
1977. V. 79. № 3. P. 544—552.
ikatan H.//Arch. Biochem. and Biophys.

биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 65.
и Н. И.//Int. J. Chem. Kinet. 1985. V. 15.

erm. 1979. V. 38. P. 435—442.
за Л. К. и др.//Научные сообщения 3-го
2. С. 121.

з В. Е. и др.//Журн. общ. химии. 1975.

2. P. 193—198.
P. 47—52.
Ed. 1944. V. 16. P. 111—116.
//Photobiochem. Photobiology. 1984. V. 7.

V. 42. № 1. P. 89—91.
P. 852—855.
c. Perkin Trans. 1987. V. 2. P. 835—839.

Поступила в редакцию
12.VIII.1987

EFFECTS OF RUTIN IN LIPID LIPIDS AND LIPOSOMES

A. V., AFANASYEV I. B.

Corporation, Moscow

) on Fe^{2+} -induced lipid peroxidation
liposomes was studied. It was shown
and liposomes in the presence of rutin
 Fe^{2+} ions to form an inactive complex
radicals. The contribution of these mecha-
nism mixture. In bovine heart microsomes
y towards LPO. At high concentrations
M), ascorbic acid blocks LPO, whereas
a prooxidative effect. A combined use of
tioxidative effect at high Fe^{2+} concentra-
centrations rutin acts as an antagonist of

УДК 577.123

ИНГИБИРОВАНИЕ И ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ОКАЗАКИ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ 5-АЗАЦИТИДИНА ИЛИ S-ИЗОБУТИЛАДЕНОЗИНА

КИРНОС М. Д., АЛЕКСАНДРУШКИНА Н. И., ВАНЮШИН В. Ф.

Установлено, что при 3-часовом инкубировании срезаемых этиолиро-
ванных проростков пшеницы возраста 72 ч с $[2-^{14}C]$ оротовой кислотой
в присутствии ингибиторов метилирования ДНК 5-азацитидина (5-azaC,
100 мкг/мл) или S-изобутиладенозина (SIBA, 1,5 мМ) репликативный син-
тез меченой ядерной ДНК в клетках первого листа подавляется на ~20%.
При этом относительные скорости включения в новообразованную яДНК
(ноДНК) меченых пиримидиновых предшественников и формирование ли-
гированных репликативных интермедиатов (ЛРИ) замедленно не изменяются.
SIBA практически полностью блокирует пострепликативное метилирова-
ние ноДНК и на ~30% ингибирует метилирование фрагментов Оказаки
(их уровень метилирования (УМ) — $100 m^3C/(C+m^3C)$ — уменьшается от
7,0—7,8 до 5,3) и ЛРИ (УМ уменьшается от 10,4 до 6,9). Под влиянием
5-azaC репликативное и пострепликативное метилирование яДНК в клет-
ках первого листа подавляется очень резко: УМ синтезированных при
этом фрагментов Оказаки и ЛРИ составляет всего лишь $1,0 \pm 0,2$. SIBA
не влияет на специфику метилирования (распределение m^3C по пирими-
диновым изоцитам в ноДНК), а в присутствии 5-azaC в ноДНК возраст-
ает относительное содержание m^3C в чередующихся Рн-Рн-Рн последо-
вательностях во фрагментах Оказаки и в лигированных репликативных
интермедиатах. Таким образом, в проростках пшеницы под влиянием SIBA
или 5-azaC существенно ингибируется метилирование яДНК: в новообра-
зованных дуплексах яДНК возникают многочисленные дополнительные
недометилированные участки и изменяется специфическая организация
метилированных сайтов в реплицирующемся ядерном геноме.

Установлено, что у растений [1—6] и у животных [1, 7—11] существ-
вуют дискретные этапы метилирования цитозинового остатков в ядерной
ДНК (яДНК) — репликативное и пострепликативное метилирование.
В свою очередь этап репликативного метилирования ДНК у растений и
животных протекает по крайней мере в две стадии: сначала метилиру-
ются фрагменты Оказаки, а затем продукты их лигирования [1—3, 7, 8].
Эти две стадии репликативного метилирования ДНК по-разному чувст-
вительны к ингибиторам и фитогормонам: в L-клетках вторая стадия
блокируется S-изобутиладенозином (SIBA), а в суспензионной культуре
клеток табака — ауксином (2,4-Д), в то время как первая стадия ре-
пликативного метилирования ДНК к этим веществам соответственно
оказалась нечувствительной [2, 8]. Мы предположили, что эти стадии
репликативного метилирования ДНК в культурах клеток могут обслу-
живаться разными по свойствам, чувствительности к ингибиторам и спе-
цифичности действия ДНК-метилазами [1, 7, 8].

В культурах растительных (суспензионная культура клеток табака
[21] и животных клеток (L-клетки мыши [7, 8]) фрагменты Оказаки
метилированы в 1,5—2 раза меньше, чем суммарная новообразованная
ДНК. О метилировании фрагментов Оказаки в клетках целого растения
до недавнего времени ничего не было известно. Разумается, неизвестно,
могут ли влиять на этот процесс в целом растении такие ингибиторы ме-
тилирования ДНК, как SIBA и 5-азацитидин (5-azaC). SIBA — синтети-

Принятые сокращения: 5-azaC — 5-азацитидин, SIBA — S-изобутиладено-
зин, яДНК — ядерная ДНК, ноДНК — новообразованная ДНК, ЛРИ — лигированные
репликативные интермедиаты, УМ — уровень метилирования ДНК ($100 m^3C/(C + m^3C)$).

ческий аналог S-аденозилметионина (SAM); подобно S-аденозилгомоцистеину (SAH) SIBA является конкурентным ингибитором многих реакций метилирования в клетке, в том числе и катализируемых ДНК-метилазами. В отличие от очень широкого действия SIBA на реакции метилирования в клетке 5-азацитидин намного более избирателен в отношении ингибирования метилирования именно ДНК; он преимущественно подавляет метилирование в результате включения в нДНК 5-азацитозинсодержащие ДНК прочно связывают ДНК-метилазы и «выводят их из игры» [12-18].

Нам удалось разработать систему методов, позволяющую выделить и очисить фрагменты Оказаки из синхронно делящихся клеток первого формирующегося листа этиолированных проростков пшеницы [3, 6]. Оказалось, что и в целом растении фрагменты Оказаки метилированы, однако в проростках пшеницы уровень метилирования ($УМ=7,0-7,5\%$ фрагментов Оказаки в 3-4 раза меньше, чем зрелой или суммарной яДНК [3, 6, 19, 20]. Как и в культуре клеток, репликативное метилирование ДНК в проростках пшеницы протекает в две стадии (метилирование фрагментов Оказаки и затем — продуктов их лигирования). Однако в отличие от культуры клеток в целом растении эти две стадии репликативного метилирования по УМ почти не различаются [3]. В результате нДНК в проростках пшеницы резко недометилированы, их цепи (дуплексы) метилированы асимметрично [3, 19]. Эта асимметрия постепенно уменьшается к концу клеточного цикла в результате пострепликативного метилирования [4, 5, 19]. Мы предположили, что такое характерное изменение уровня и асимметрии цепей ДНК в клеточном цикле может служить эффективным механизмом регуляции как транскрипции, так и репликации [5, 19]. В частности, скоординированные репликативное и пострепликативное метилирование ДНК могут определять очередность и точность репликации тех или иных компарментов генома. На наш взгляд, то или иное воздействие (в том числе и ингибиторами) на соответствующие этапы метилирования яДНК может изменить временную организацию репликации генов и их экспрессию. Детальное изучение метилирования ДНК, в том числе и на ранних этапах репликации (фрагменты Оказаки), важно для расшифровки роли этой энзиматической модификации генома в процессах клеточной дифференцировки и морфогенеза растений.

Ранее мы разработали специфическую от примесей фракционирования клеток первого листицифичность метилирования вполне надежными критерия тилирования ДНК в клетках вание яДНК скоординирована тилаза — компонент реплика плекс, скорее всего, являет мас в нем относительно фи положили, что «репликатив пликативной» ДНК-мстила фоне повышенных concentra SAM и его аналоги [5].

В настоящей работе продолжено исследование репликации и репликативного метилирования яДНК: изучено влияние ингибиторов метилирования SIBA и 5-azaC на скорость репликации, уровень и специфичность метилирования фрагментов Оказаки в S-фазе клеточного цикла синхронно и многократно делящихся клеток первого формирующегося листа этиолированных проростков пшеницы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проращивание семян пшеницы Мироновская 808, синхронизацию роста проростков и выделение меченных $[2-^{14}\text{C}]$ оротовой кислотой и $\text{L}-[\text{метил-}^{14}\text{C}]$ метионинном фрагментах Оказки из синхронно проходящих раннюю S-фазу клеточного цикла клеток первого листа, а также анализ уровня и специфичности их метилирования проводили, как описано ранее [3, 6, 20, 21]. Этилированные проростки (200—500 шт.) срезади в начале S-фазы в клетках первого листа, 71—74 ч развития) и инкубировали в течение 30 мин в растворе SIBA (1,5 мМ) фирмы «Calbiochem» (США) или 5-азас-100 мкг/мл) фирмы «Serva» (ФРГ) в присутствии 100 мкг/мл EtBr , а затем еще 3 ч в таких же растворах в присутствии $[2-^{14}\text{C}]$ оротовой кислоты (200—500 мкКи/мл «Изотоп» (СССР), удельная радиоактивность, $\text{УР}=43,4 \text{ мКи/ммоль}$) или $\text{L}-[\text{метил-}^{14}\text{C}]$ метионина (500 мкКи/мл—Институт изотопов (Венгрия), $\text{УР}=21,8 \text{ мКи/ммоль}$).

Менские проростки растирали при температуре жидкого азота, лизировали в смеси, содержащей 0,1 М трис-HCl-буфер, 0,1 М NaCl-ЭДТА, 1% DS-Na, pH 7,5—8,0, и выделяли высокополимерную ДНК фракционированием лизата путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl [6, 21].

Меченые репликативные фрагменты новообразованной яДНК (ноДНК) выделяли в щелочном градиенте концентраций (5–20%) сахарозы, как уже было описано [3, 6]. Уровень метилирования ($UM=100\ m^5C/(C+m^5C)$) меченных [$2\text{-}^{14}C$] оротовой кислотой репликативных фрагментов определяли после их гидролиза до оснований, разделения оснований двумерной ТСХ на целлюлозе и измерения радиоактивности в С¹⁸

(SAM); подобно S-аденозилгомо-
курентным ингибитором многих
ом числе и катализируемых ДНК-
рокового действия SIBA на реакции
и намного более избирателен в от-
ношении ДНК; он преимущест-
венно в результате включения в нДНК,
о связывают ДНК-метилазы и «вы-

у методов, позволяющую выделить
хронно делящихся клеток первого
ных проростков пшеницы [3, 6].
фрагменты Оказаки метилированы,
есть метилирования (УМ=7,0—7,5)
ише, чем зрелой или суммарной
е клеток, репликативное метилиро-
протекает в две стадии (метилиро-
продуктов их лигирования). Одна-
целом растений эти две стадии ре-
и почти не различаются [3]. В ре-
ицы резко недометилированы, их
симметрично [3, 19]. Эта асимметрия
еточного цикла в результате пост-
[3, 19]. Мы предположили, что такое
имметрии цепей ДНК в клеточном
механизмом регуляции как транс-
З частности, скоординированные ре-
етилирование ДНК могут опреде-
еи тех или иных компарментов
е воздействия (в том числе и инги-
и метилирования яДНК может из-
ликации генов и их экспрессию. Де-
ИК, в том числе и на ранних этапах
важно для расшифровки роли этой
а в процессах клеточной дифферен-

исследование репликации и репли-
учено влияние ингибиторов метили-
репликации, уровень и специфич-
казаки в S-фазе клеточного цикла
я клеток первого формирующегося
пшеницы.

СЛЕДОВАНИЯ

вская 808, синхронизацию роста проростков
слотой и L-[метил-¹⁴C]метионином фрагмен-
иую S-фазу клеточного цикла клеток пер-
ицифичности их метилирования проводили, как
нные проростки (200—500 шт.) срезали (в
1—74 ч развития) и инкубировали в те-
ирмы «Calbiochem» (США) или 5-azaC
исутствии 100 мкг/мл EIBr, а затем еще 3 ч
C]оротовой кислоты (200—500 мКи/мл—
ость, УР=43,4 мКи/ммоль) или L-[метил-
изотопов (Венгрия), УР=21,8 мКи/ммоль).
пературе жидкого азота, лизировали в сме-
М Na₄-ЭДТА, 1% DS-Na, pH 7,5—8,0, и вы-
онированием лизата путем центрифугирова-

овообразованной яДНК (ноДНК) выделяли
20%) сахарозы, как уже было описано [3].
C/(C+m³C)) меченных [2-¹⁴C]оротовой кис-
или после их гидролиза до оснований, разде-
лозе и измерения радиоактивности в С

m³C [20]. Для определения сайтовой специфичности метилирования (ССМ) фрагмен-
ты ДНК гидролизовали до пиримидиновых последовательностей по методу Бартон и
Петерсена [22], которые разделяли по длине и составу путем двумерной ТСХ на
ДЭАЭ-целлюлозе [20]. ССМ оценивали по количеству меченых остатков m³C в после-
довательности Pu-m³C-Pu, в % от всего меченого m³C в нДНК. Для определения
ССМ в меченных [2-¹⁴C]оротовой кислотой фрагментах репликации выделенные из них
моно- и полипиримидиновые блоки гидролизовали до оснований и измеряли радиоак-
тивность в остатках m³C. Расчет ССМ меченных L-[метил-¹⁴C]метионином репликатив-
ных фрагментов проводили по формуле (2) (см. раздел «Результаты и их обсужде-
ние»), не гидролизуя пиримидиновые дезоксирибоолигонуклеотиды до оснований. Ра-
диоактивность проб измеряли в диоксановом сцинтиляторе с помощью жидкостно-
сцинтилляционного счетчика Mark III фирмы «Tracor Analytic» (Голландия). Эффек-
тивность счета составляла 85—90%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы разработали систему методов, позволяющую выделить сво-
бодную от примесей фракцию фрагментов Оказаки из синхронно деля-
щихся клеток первого листа проростков пшеницы [3, 6]. Уровень и спе-
цифичность метилирования этих фрагментов репликации являются
вполне надежными критериями дискретности этапа репликативного ме-
тилирования ДНК в клетках эукариот [3, 6]. Репликативное метилиро-
вание яДНК скоординировано с ее репликативным синтезом (ДНК-ме-
тилаза — компонент репликативного комплекса?). Репликативный ком-
плекс, скорее всего, является компонентом ядерного матрикса и зани-
мает в нем относительно фиксированное положение [23, 24]. Мы пред-
положили, что «репликативная» ДНК-метилаза в отличие от «постре-
пликативной» ДНК-метилазы «приспособлена» функционировать на
фоне повышенных концентраций SAM и должна более четко различать
SAM и его аналоги [5].

Мы изучили влияние SIBA на синтез и отдельные стадии реплика-
тивного метилирования яДНК в первом листе этилированных пророст-
ков пшеницы. Предварительно мы убедились в том, что в присутствии
высоких концентраций SIBA (1,5 мМ) в среде инкубации УМ новообра-
зованной в течение 3 ч инкубации с меткой ([2-¹⁴C]оротовая кислота)
яДНК почти не изменяется в отличие от равномерно возрастающего
УМ яДНК в контрольных проростках (рис. 1). Это означает, что SIBA
почти полностью ингибирует пострепликативное метилирование нДНК.
При более длительных инкубациях (5—6 ч) эта нДНК все же домети-
лируется (рис. 1). Вероятно, это связано с разрушением SIBA в клетках
первого листа.

Мы изучили влияние SIBA на метилирование собственно фрагментов
Оказаки (табл. 1). Для этого мы выделяли фрагменты Оказаки из
яДНК проростков, инкубированных с [2-¹⁴C]оротовой кислотой в те-
чение 3 ч. Около 95—98% нДНК представлено ЛРИ (≥15S, рис. 2), ко-
торые уже дополнительно метилированы в результате пострепликатив-
ного метилирования. На это указывает их более высокий УМ по сравне-

Таблица 1

Уровень (УМ) и сайтовая специфичность метилирования (ССМ) нДНК
в первом листе проростков пшеницы

Размер репликативного фрагмента ДНК, величина S	Условия инкубирования проростков *	УМ	ССМ
		100m ³ C/(C+m ³ C)	Содержание m ³ C в Pu-m ³ C-Pu, % от всего m ³ C в нДНК
≤5	Контроль	7,8±0,4	18,5±1,5
≤15		10,4±0,2	46,0±2,0
≤5	SIBA	5,3±0,3	21,7±2,0
≤15		6,9±0,4	45,0±2,0
≤5	1,7 мкг/мл	1,0±0,2	33,1±1,4
≤15	5-azaC	1,0±0,2	52,0±3,0
≥15	100 мкг/мл		

* Условия инкубирования проростков: срезанные проростки возраста 72 ч инкубировали 30 мин в рас-
творах SIBA или 5-azaC, а затем еще 3 ч в присутствии ингибиторов и [2-¹⁴C]оротовой кислоты или L-[ме-
тил-¹⁴C]метионина.

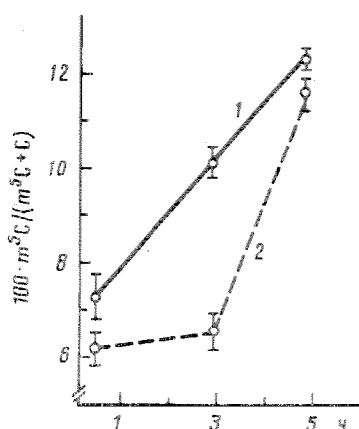


Рис. 1

Рис. 1. Динамика изменения уровня метилирования ($YM = 100m^2C / (C + m^2C)$) яДНК, новообразованной в присутствии SIBA в клетках первого листа этилированных проростков пшеницы. 72-Часовые проростки срезали, инкубировали в течение 30 мин в присутствии 1,7 мг/мл SIBA, а затем еще в течение 0,5, 3 и 5 ч в таком же растворе, содержащем $[2-^{14}C]$ оротовую кислоту. Из первого листа выделяли ДНК и определяли УМ меченой нДНК. 1 — контроль, 2 — SIBA

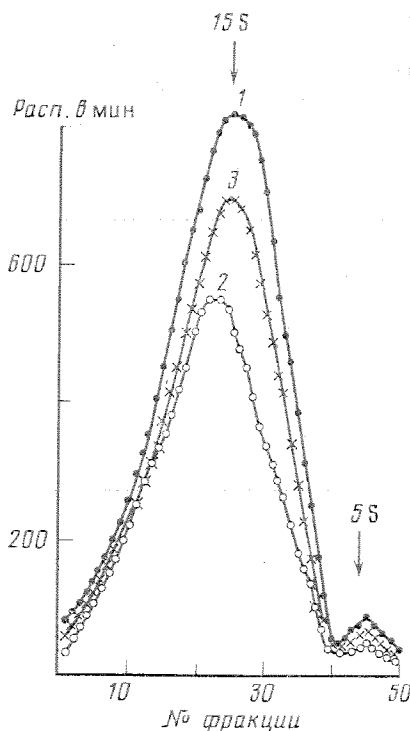


Рис. 2

Рис. 2. Профили распределения радиоактивности меченой $[2-^{14}C]$ оротовой кислотой новообразованной в присутствии SIBA и 5-азаС яДНК в клетках первого листа этилированных проростков пшеницы в щелочном сахарозном градиенте. 72-Часовые срезы проростков инкубировали в присутствии $[2-^{14}C]$ оротовой кислоты и одного из ингибиторов метилирования (SIBA, 5-азаС) в течение 3 ч, а затем выделяли яДНК с помощью центрифугирования лизата клеток в градиенте $CsCl$ [6], нДНК фракционировали в щелочном градиенте концентрации сахарозы (5—20%) в роторе SW-28 на центрифуге Spinco L8-70 фирмы «Beckman» (США) при 20°, 20 000 об/мин, в течение 20 ч. Фракции (по 0,7 мл) собирали со дна пробирки. В аликвотах (5—10% от объема фракции) измеряли радиоактивность. 1 — контроль, 2 — SIBA, 3 — 5-азаС

нию с фрагментами Оказаки (табл. 1, рис. 1). Остальные 2—5% радиоактивности нДНК принадлежат собственно фрагментам Оказаки. В такой постановке опыта мы смогли оценить влияние ингибиторов непосредственно на первую стадию репликативного метилирования ДНК — метилирование фрагментов Оказаки, а также и в определенной мере на пострепликативное метилирование новообразованной в их присутствии яДНК. Можно видеть, что SIBA ингибирует первую стадию репликативного метилирования яДНК: УМ фрагментов Оказаки в присутствии этого ингибитора заметно (на 35%) ниже контроля (табл. 1). Кроме ингибирования метилирования фрагментов Оказаки, SIBA, по-видимому, подавляет и вторую стадию репликативного метилирования ДНК — метилирование лигированных фрагментов: на это указывает то, что лигированные ($\geq 15S$) фрагменты в присутствии SIBA метилированы в меньшей степени, чем фрагменты $\geq 15S$ и фрагменты Оказаки в контрольных проростках (табл. 1). Таким образом, SIBA ингибирует как репликативное, так и пострепликативное метилирование яДНК. Однако пострепликативное метилирование подавляется SIBA гораздо сильнее, чем репликативное метилирование яДНК. Следовательно, SIBA можно

Условия инкубирования проростков *	Выделено ДНК	
	метка: $[2-^{14}C]$ оротовая кислота	метка: L-мет
Контроль (к)	1,5	1,4
SIBA, 1,7 мг/мл	1,0	1,1
5-азаС 100 мкг/мл	1,3	1,1

* Условия инкубирования проростков

использовать в качестве ингибитора метилирования ДНК и, следовательно, «ДНК-метилазы» ДНК-метилазы исключено, что эти ДНК-метилазы. Любопытно отметить, что ДНК SIBA заметно (на 23%) ингибирует метилирование ДНК (см. табл. 2) [25]. При лигировании фрагментов Оказаки в присутствии SIBA метилирование практически не отличается от контроля (рис. 2). К сожалению, метилирование проростков пшеницы пока не удается реализовать с помощью SIBA реализует метилирование ДНК. В то же время включение в ДНК новообразованных предшественников (C+T) по сравнению с контролем ингибировано, что ингибирование пострепликативного метилирования в присутствии SIBA асимметрично: в предыдущей S-фазе, обретают компетентность к метилированию. Влияние этого ингибитора на метилирование делящихся клеток растений микробов: задержке вступления генома в клеточный цикл, снижать собственно скорость репликации активности «репликативного компонента» репликативного компонента.

На наш взгляд, для установления механизма действия SIBA от репликативного метилирования такой ингибитор метилирования. В клетке он фосфорилируется механизмом вместо dCMP [26] 5-азаС-содержащей ДНК и участвует в метилировании ДНК у высших растений. Ранее мы установили, что метилирование ДНК на пострепликативное метилирование. Следовательно, он не должен метилировать цепей по содержанию метилирования. Он мог бы повлиять на скорость метилирования ДНК в проростках пшеницы. Метилирование предшественников метилирования или 3H -тимидина [25]. При

Синтез и состав нДНК в первом листе проростков пшеницы

Условия инкубирования проростков *	Выделено ДНК, мг		Удельная радиоактивность (УР) нодНК; расп. в мин на 1 мкг ДНК				Состав нодНК 100(m^3C+C)/ /(m^3C+C+T)
	метка: [2- ^{14}C]оро- товая кислота	метка: L-[метил- ^{14}C] метионин	[2- ^{14}C]ороговая кислота		L-[метил- ^{14}C]ме- тионин		
			УР	% от к	УР	% от к	
Контроль (К)	4,5	1,8	870	100	353	100	39,5 \pm 0,5
SIBA, 1,7 мг/ /мл	1,0	1,6	670	77	214	60	40,8 \pm 1,0
5-азаС 100 мкг/мл	1,3	1,2	700	80	292	83	39,5 \pm 0,6

* Условия инкубирования проростков см. в табл. 1.

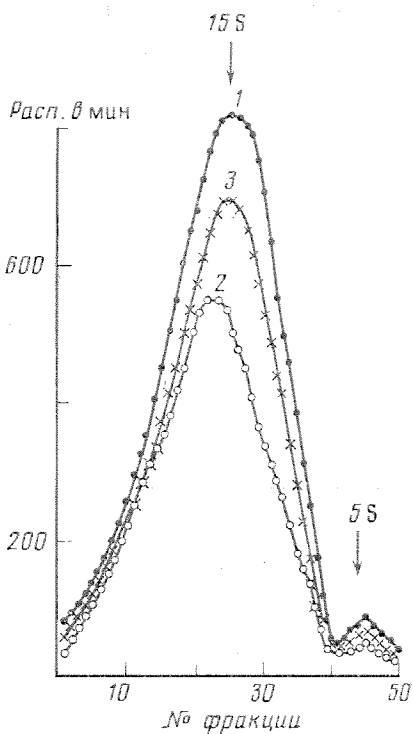


Рис. 2

ирования ($УМ=100m^3C/(C+m^3C)$) яДНК клетках первого листа этиолированных проростков, инкубировали в течение 30 мин в течение 0,5, 3 и 5 ч в таком же растворе, первого листа выделяли ДНК и определяли — контроль, 2 — SIBA

ивности меченной [2- ^{14}C]оротовой кислотой 5-азаС яДНК в клетках первого листа этиолированных проростков, инкубировали в течение 30 мин в течение 0,5, 3 и 5 ч в таком же растворе, первого листа выделяли ДНК и определяли — контроль, 2 — SIBA, 3 — 5-азаС

1, рис. 1). Остальные 2—5% радиоактивности фрагментам Оказаки. И оценить влияние ингибиторов нелинейного метилирования ДНК —, а также и в определенной мере на новообразованной в их присутствии ингибирует первую стадию репликации фрагментов Оказаки в присутствии это же контроля (табл. 1). Кроме ингибиторов Оказаки, SIBA, по-видимому, активного метилирования ДНК — метов: на это указывает то, что лигирования SIBA метилированы в $\geq 15S$ и фрагменты Оказаки в конкретном образе, SIBA ингибирует как активное метилирование яДНК. Однако подавляется SIBA гораздо сильнее, яДНК. Следовательно, SIBA можно

использовать в качестве инструмента, дискриминирующего эти два этапа метилирования ДНК и, по-видимому, «репликативную» и «пострепликативную» ДНК-метилазные активности в растительной клетке. Не исключено, что эти ДНК-метилазы обладают разным сродством к SIBA. Любопытно отметить, что наряду с ингибированием метилирования ДНК SIBA заметно (на 23%) ингибирует и репликативный синтез яДНК (см. табл. 2) [25]. При этом соотношение скоростей синтеза и лигирования фрагментов Оказаки не изменяется: распределение меченой в присутствии SIBA нДНК по длине в щелочном градиенте сахарозы практически не отличается от нДНК контрольных проростков (рис. 2). К сожалению, механизм влияния SIBA на синтез ДНК в проростках пшеницы пока не известен. Возможно, что подавление синтеза с помощью SIBA реализуется на уровне фондов предшественников синтеза ДНК. В то же время в присутствии SIBA относительные скорости включения в ДНК новообразованных из [2- ^{14}C]оротовой кислоты пиримидиновых предшественников синтеза (величина $100 (C+m^3C)/(m^3C+C+T)$) по сравнению с контролем не изменяются (табл. 2). Не исключено, что ингибирование синтеза ДНК SIBA связано и с подавлением пострепликативного метилирования яДНК в клеточном цикле: в присутствии SIBA асимметрично метилированные дуплексы яДНК, возникшие в предыдущей S-фазе, не метилируются и, следовательно, не приобретают компетентность к новому циклу репликации [5, 19]. Тем самым влияние этого ингибитора метилирования яДНК на репликацию в делящихся клетках растений может заключаться в нарушении ее динамики: задержке вступления в репликацию отдельных компартментов генома в клеточном цикле. Наконец, не исключено, что SIBA может снижать собственно скорость репликативного синтеза яДНК путем ингибирования активности «репликативной» ДНК-метилазы как компонента репликативного комплекса.

На наш взгляд, для установления зависимости скорости репликации от репликативного метилирования более адекватно может послужить такой ингибитор метилирования ДНК, как 5-азаС.

В клетке он фосфорилируется и включается в ДНК по матричному механизму вместо dCMP [26, 27]. ДНК-метилаза прочно связывается с 5-азаС-содержащей ДНК и «выходит из игры» [27]. О влиянии 5-азаС на метилирование ДНК у высших растений практически ничего не известно. Ранее мы установили, что 5-азаС в свободном виде не влияет на пострепликативное метилирование яДНК в проростках пшеницы [5]. Следовательно, он не должен оказывать влияния на определяемое асимметрией цепей по содержанию m^3C вступление ДНК в репликацию, но мог бы повлиять на скорость репликативного синтеза. Действительно, как мы установили здесь (табл. 2) и ранее [25], этот ингибитор метилирования ДНК в проростках пшеницы ингибирует включение в нее меченых предшественников синтеза: [2- ^{14}C]оротовой кислоты (табл. 2) или 3H -тимидина [25]. При этом, как и в случае SIBA, в присутствии

5-azaC соотношение скоростей синтеза и лигирования фрагментов репликации не изменяется (рис. 2).

Мы установили, что при инкубировании проростков с 5-azaC этот ингибитор резко и почти полностью (на 80–90%) подавляет метилирование фрагментов Оказаки в первом листе (табл. 1). Новообразованная в присутствии 5-azaC яДНК так и остается почти совсем неметилированной: УМ фрагментов Оказаки ($УМ=1,0\pm0,2$) и лигированной ДНК ($\geq 15S$ $УМ=1,0\pm0,2$) практически одинаков (табл. 1). Следовательно, и в растительных клетках, как и в клетках животных [27] 5-azaC блокирует метилирование, только включившись в ДНК.

Анализ действия SIBA и 5-azaC на синтез и репликативное метилирование яДНК в клетках высшего растения (пшеница) приводит к заключению, что репликативное метилирование яДНК непосредственно не влияет на скорость репликации генома в этом же клеточном цикле. Так, одно и то же уменьшение скорости репликации (на ~20%) наблюдается как при ингибировании репликативного метилирования на 30–40% SIBA, так и на фоне почти полного его подавления 5-azaC (табл. 1, 2).

Следует подчеркнуть, что почти полное блокирование метилирования синтезированных в присутствии 5-azaC фрагментов Оказаки заметно не сказывается на их последующем лигировании. Иными словами, второй этап репликативного синтеза ДНК — лигирование фрагментов Оказаки — относительно независим от метилирования. К сожалению, механизмы резкого подавления метилирования нДНК 5-азацитидином все еще не ясны. Можно думать, что вновь синтезированная 5-azaC-содержащая ДНК прочно связывает ДНК-метилазу и инактивирует ее [13–15, 17, 18]. Это может означать, во-первых, что содержащие 5-azaC зоны формирующегося хроматина должны быть значительно обогащены связанной ДНК-метилазой и, во-вторых, «прочное» связывание фермента с синтезированными фрагментами, по-видимому, почему-то не мешает их лигированию.

К настоящему времени уже имеются отдельные указания на то, что метилирование ДНК может рассматриваться как возможный механизм контроля за репликацией. Так, например, у *dam*-мутантов *E. coli* репликация плазмидной ДНК не происходит, она разрешается в этих клетках только метилированным этой метилазой *in vitro* плазмидам [28, 29]. По нашим предварительным данным, после инкубации целых проростков пшеницы в присутствии 5-azaC синхронная репликация яДНК в последующих клеточных циклах в клетках первого листа резко подавлена. Существует представление о том, что в репликацию могут вступать лишь симметрично прометилированные дуплексы ДНК [5, 19, 30]. Значит, начавшаяся в присутствии 5-azaC репликация исходной ДНК, по-видимому, может завершиться, а у сформированных дочерних молекул ДНК с полуметилированными участками она уже заметно искажена и затруднена.

Зависимость скорости репликации генома от его метилирования у растений, по-видимому, определяется компетентностью тех или иных кластеров репликонов к репликации, что, вероятно, зависит от того, насколько быстро в клетке уменьшается степень асимметрии комплементарных цепей ДНК по содержанию остатков m^5C [5, 19]. Следовательно, временная организация репликации тех или иных компартментов генома будет зависеть от степени завершенности метилирования цепей ДНК, новообразованных в предыдущем цикле ее репликации. Таким образом, репликация ядерного генома — последовательность (очередность) репликации отдельных его участков — должна зависеть от скоординированности процессов репликативного и пострепликативного метилирования ДНК. Поскольку два этапа энзиматической модификации ДНК могут избирательно регулироваться ингибиторами метилирования и фитогормонами [2, 5, 31], это дает принципиальную возможность более-менее направленного влияния на клеточную дифференцировку и рост растений посредством модуляции метилирования ядерного генома в мери-

стематических зонах вышестоящего ингибирования 5-azaC точного цикла индуцирует инициацией 5-azaC на метилирование организации репликации. Мы установили, что под влиянием дифференцировки и репродуцируются репликативный цикл [2, 31, 36]. По-видимому, к концу индукция клеточной репликации включает формирование новых под действием ядерного генома.

В качестве показателя (ССМ) ДНК удобно использовать m^5C в чередующейся нопиримидиновых последовательностях в результате кислотного гидролиза, что в ДНК животных метилирована именно в этой последовательности всего лишь 20% всех цитозинов.

ССМ яДНК на двух стадиях: фрагменты Оказаки (первый лист) в клетках животных метилированы в блоках (ССМ-20), а монопириимидиновой фракции в ССМ на двух стадиях чередующийся дискретный метилирования высших растений безразлично определенную роль при формировании. Поэтому было интересно модифицировать также репликацию. Мы исследовали репликативных интермедиатов в присутствии SIBA и 5-azaC предшественника — L-метионина.

«Короткоживущие» в клетках подвержены пострепликативной модификации в описанных условиях выделенной от мтДНК и продуцируемой. Цифричность метилирования из L-[метил- ^{14}C]метионина, метилины в остатках m^5C содержащейся в нДНК из L-[метил- ^{14}C]метионина в пуриновых основаниях активность сравнительно небольшое количество (мол. %) этого метилирования [20]). Так как в цитозиновиновой метка во фракции рСР составляет менее 3–5% остатков m^5C во фракции рСР, то метилины составят величину

относительная доля m^5C метилиностей от всего m^5C фракции рСР

100рСр/($R_{n+1, n \geq 2}$ — радиоактивность в полипириимидиновых

а и лигирования фрагментов ре-
 ании проростков с 5-azaC этот ин-
 80—90%) подавляет метилирова-
 исте (табл. 1). Новообразованная
 ается почти совсем неметилиро-
 1=1,0±0,2) и лигированной ДНК
 динаков (табл. 1). Следовательно,
 стках животных [27] 5-azaC бло-
 ишись в ДНК.

а синтез и репликативное метили-
 стения (пшеница) приводит к за-
 ирование яДНК непосредственно
 мома в этом же клеточном цикле.
 и репликации (на ~20%) наблю-
 кативного метилирования на 30—
 полного его подавления 5-azaC

льное блокирование метилирования
 2 фрагментов Оказаки заметно не-
 ировании. Иными словами, второй
 лигирование фрагментов Оказа-
 лирования. К сожалению, меха-
 нания ноДНК 5-азацитидином все
 вь синтезированной 5-azaC-содер-
 метилазу и инактивирует ее [13—
 первых, что содержащие 5-azaC
 жны быть значительно обогащены
 их, «прочное» связывание фермен-
 по-видимому, почему-то не меша-

ся отдельные указания на то, что
 иваться как возможный механизм
 мер, у *dam*-мутантов *E. coli* ре-
 ходит, она разрешается в этих
 й метилазой *in vitro* плазмидам
 данным, после инкубации целых
 5-azaC синхронная репликация
 пах в клетках первого листа резко
 о том, что в репликацию могут
 ированные дуплексы ДНК [5, 19,
 ии 5-azaC репликация исходной
 ся, а у сформированных дочерних
 ии участками она уже заметно ис-

и генома от его метилирования у
 компетентностью тех или иных
 что, вероятно, зависит от того, на-
 я степень асимметрии компонен-
 татков m^3C [5, 19]. Следова-
 тельно тех или иных компартов
 зршенности метилирования цепей
 ем цикле ее репликации. Таким об-
 -последовательность (очередность)
 должна зависеть от скоординиро-
 и пострепликативного метилирова-
 матической модификации ДНК мо-
 ибиторами метилирования и фито-
 ипиальную возможность более-ме-
 ную дифференцировку и рост рас-
 ирования ядерного генома в мери-

стематических зонах высших растений. Так, в культуре животных кле-
 ток ингибирование 5-azaC метилирования яДНК на ранней S-фазе кле-
 точного цикла индуцирует клеточную дифференцировку [27]. Под влия-
 нием 5-azaC на метилирование ДНК отмечено изменение временной
 организации репликации отдельных локусов X-хромосомы [27; 32—35].
 Мы установили, что под влиянием фитогормонов — индукторов клеточ-
 ной дифференцировки и регуляторов роста и развития растений — инги-
 бируются репликативный синтез и репликативное метилирование яДНК
 [2, 31, 36]. По-видимому, как в клетках животных, так и у высших рас-
 тений индукция клеточной дифференцировки в качестве необходимого
 этапа включает формирование неометилированных участков ДНК, воз-
 никающих под действием тех или иных агентов на реплицирующийся
 ядерный геном.

В качестве показателя сайтовой специфичности метилирования
 (ССМ) ДНК удобно использовать данные по относительному содержа-
 нию m^3C в чередующейся Рн-Рн-Рн последовательности (фракции мо-
 нопиримидиновых последовательностей, выщепляемых из ДНК в ре-
 зультате кислотного гидролиза с дифениламином [22]) [3]. Характер-
 но, что в ДНК животных и растений почти половина всего m^3C лока-
 лизована именно в этой последовательности [20], хотя в ней содержит-
 ся всего лишь 20% всех цитозиновых остатков яДНК [20].

ССМ яДНК на двух стадиях репликативного метилирования различ-
 на: фрагменты Оказаки (первая стадия) как у высших растений, так и
 в клетках животных метилированы преимущественно в полипиримиди-
 новых блоках (ССМ-20), а участки лигирования (вторая стадия) — в
 монопиримидиновой фракции (ССМ ≥ 80) [3, 6]. Четкие и резкие раз-
 личия в ССМ на двух стадиях репликации яДНК позволяют думать, что
 чередующийся дискретный характер организации с разной специфич-
 ностью метилированных последовательностей в реплицирующейся ДНК
 высших растений не безразличен для ДНК-белкового узнавания и играет
 определенную роль при формировании хроматина разных уровней орга-
 низации. Поэтому было интересно выяснить, может ли наряду с уров-
 нем модулироваться также и специфичность метилирования яДНК при
 репликации. Мы исследовали ССМ фрагментов Оказаки и лигирован-
 ных репликативных интермедиатов, сформированных как без, так и в
 присутствии SIBA и 5-azaC. При этом мы использовали два меченых
 предшественника — L-[метил- ^{14}C]метионин и [2- ^{14}C]оротовую кислоту.

«Короткоживущие» в клетке фрагменты Оказаки практически не
 подвержены пострепликативному метилированию [6]. Кроме того,
 в описанных условиях выделения [6] эту фракцию можно получить сво-
 бодной от мтДНК и продуктов деградации яДНК. Мы исследовали спе-
 цифичность метилирования фрагментов Оказаки по включению метки
 из L-[метил- ^{14}C]метионина. Как установлено ранее, в проростках пше-
 ницы в остатках m^3C содержится не более 50% радиоактивности, вклю-
 ченной в ноДНК из L-[метил- ^{14}C]метионина; остальная метка обнару-
 живается в пуриновых основаниях и тимине ДНК [3, 36]. Эту радио-
 активность сравнительно просто учесть, измерив метку в рТр и
 количество (мол.%) этого нуклеотида в ДНК (величина 6,65 мол.%
 [20]). Так как в цитозиновые остатки ноДНК из L-[метил- ^{14}C]метиони-
 на включается менее 3—5% от радиоактивности всех оснований, почти
 вся метка во фракции рСр принадлежит р m^3C р. Значит, радиоактив-
 ность остатков m^3C во фракции полипиримидиновых последовательно-
 стей составит величину

$$P_{n,p_{n+1}, n \geq 2} - 3,18p_{Tr}, \quad (1)$$

а относительная доля m^3C во фракции монопиримидиновых последова-
 тельностей от всего m^3C фрагментов Оказаки равна

$$100p_{Cp}/(p_{Cp} + P_{n,p_{n+1}, n \geq 2} - 3,18p_{Tr}), \quad (2)$$

где $P_{n,p_{n+1}, n \geq 2}$ — радиоактивность, включенная из L-[метил- ^{14}C]метио-
 нина в полипиримидиновые блоки; рТр и рСр — радиоактивность в мо-

нопириимидиновой фракции дезокситимидиловой и дезоксицитидиловой кислотах соответственно. Следовательно, для определения ССМ фрагментов Оказаки, меченных L-[метил- ^{14}C]метионином, нужно разделить по составу и выделить из ДНК монопириимидиновые нуклеотиды рСр и рТр, а также получить суммарный нуклеотидный материал меченых полипириимидиновых последовательностей. Таким путем, однако, нельзя определить ССМ лигированных фрагментов, поскольку их распределение в щелочном сахарозном градиенте почти совпадает с распределением молекул суммарной яДНК, в которые включается метка из L-[метил- ^{14}C]метионина в результате постоянно осуществляемого в клеточном цикле процесса пострепликативного метилирования [6]. Следовательно, во фракциях градиента, содержащих фрагменты ДНК $>5\text{S}$, будут находиться как новообразованные, меченные по остаткам $m^3\text{C}$, Т, А и С, так и еще не вступившие в репликацию, меченные только по остаткам $m^3\text{C}$ последовательности яДНК. Поэтому ССМ лигированных интермедиатов мы определяли в ноДНК, меченной [2- ^{14}C]оротовой кислотой. Для этого фракции рСр и полипириимидиновые последовательности гидролизовали до оснований и измеряли включенную в собственно остатки $m^3\text{C}$ радиоактивность. В такой постановке опыта мы смогли оценить ССМ исключительно новообразованных в присутствии меченого предшественника и ингибиторов метилирования ЛРИ, а не суммарной яДНК.

Как и ранее это было выявлено [3, 6], фрагменты Оказаки существенно отличаются от лигированных ноДНК (табл. 1) не только по уровню, но и по характеру метилирования (распределению $m^3\text{C}$ по пириимидиновым последовательностям). Во фрагментах Оказаки проростков пшеницы преимущественно метилируются цитозиновые остатки в полипириимидиновых ($\text{Pu}_n\text{P}_{n+1}, n \geq 2$) последовательностях, а у лигированных ноДНК на долю $m^3\text{C}$ в этих последовательностях приходится только около 50% от всех возникших в ноДНК остатков $m^3\text{C}$ (табл. 1). Можно видеть (табл. 1), что несмотря на заметное (~30%-ное) ингибирование метилирования новообразованной в присутствии SIBA яДНК ССМ фрагментов Оказаки и ЛРИ контрольных и опытных проростков практически не различаются. Следовательно, конкурентное ингибирование метилирования репликативных фрагментов в данном случае заметно не изменяет его специфичность.

Однако наблюдаемое в присутствии 5-азаС небольшое «остаточное» метилирование как фрагментов Оказаки, так и линкерных зон реализуется в Рн-С-Рн последовательностях в относительно большей степени, чем в контрольных проростках. Вероятно, это может объясняться тем, что при хаотическом замещении остатков С на остатки 5-азацитозина этот аналог будет распределен между моно- и полипириимидиновыми фрагментами ноДНК пропорционально распределению в них остатков С (в отношении ~1:3 [20]). Следовательно, по сравнению с монопириимидиновыми полипириимидиновые 5-азаС-содержащие блоки будут ингибировать действие ДНК-метилазы в гораздо большей степени. В результате мы наблюдаем относительное «усиление» метилирования цитозиновых остатков в Рн-С-Рн последовательностях.

Итак, с помощью ингибиторов метилирования SIBA и 5-азаС здесь и ранее показана возможность дифференцированного влияния на процессы репликативного и пострепликативного метилирования яДНК в клетках высших растений. Характер и степень влияния этих ингибиторов на синтез и отдельные этапы метилирования яДНК, как и собственно механизм их влияния различны. Это позволяет использовать SIBA и 5-азаС в качестве новых эффективных инструментов для более глубокого изучения метилирования ДНК, клеточной дифференцировки и развития растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanyushin B. F. // Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1984. V. 108. P. 99—114.

2. Башките Е. А., Кирнос М. Д. № 8. С. 1448—1456.
3. Кирнос М. Д., Кутыева Л. Т. 49. № 8. С. 1357—1366.
4. Кирнос М. Д., Ганичева Н. Т. 49. № 10. С. 1690—1702.
5. Кирнос М. Д., Александрович № 4. С. 625—637.
6. Кирнос М. Д., Александрович 1988. Т. 53. № 8. С. 1397—1400.
7. Kiryanov G. I., Kirnos M. D. № 2. P. 225—228.
8. Кирьянов Г. И., Исаева Л. С. 153—161.
9. Woodcock D. M., Adams J. A. № 1. P. 15—22.
10. Woodcock D. M., Crowther P. acta. 1984. V. 783. № 2. P. 227.
11. Bigler B., Bertaux O., Valenc 12. Friedman S. // Molecular Pharm 13. Jones P. A., Taylor S. M. // Nu 14. Creusot F., Acs G., Christman 15. Taylor S. M., Jones P. A. // J. M 16. Bouchard J., Mompalmer R. L. 17. Santi D. V., Norment A., Ga P. 6993—6997.
18. Веножинский М. Т., Пестере мия. 1985. Т. 50. № 5. С. 749—
19. Кирнос М. Д., Александрович 1988. Т. 53. № 3. С. 355—367.
20. Кирнос М. Д., Александрович № 8. С. 1458—1474.
21. Кирнос М. Д., Волкова С. А. С. 1587—1596.
22. Burton K., Petersen G. B. // Bloc 23. Jackson D. A., McCready S. J., 24. Краевский А. А., Куханова Л биология». М.: ВИНТИ, 1986
25. Ашапкин В. В., Александрович мия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1587—
26. Vesely J., Cihak A. // Pharmac. T 27. Jones P. A. DNA methylation, lin; Heidelberg; Tokyo: Springer 28. Smith D. W., Garland A. M., P. 1319—1326.
29. Messer W., Bellekes U., Lothe 30. Taylor J. H. DNA synthesis: P. P. 143—159.
31. Кирнос М. Д., Артюховская Н Т. 51. № 11. С. 1875—1885.
32. Shafer D. A., Priest J. H. // Ame 33. Gregory P., Greene C., Shapira P. 234—236.
34. Schmidt M., Wolf S. F., Mige 35. Jablonka E., Goitein R., Sperlin 36. Артюховская Н. А., Александрович Т. 51. № 11. С. 1868—1874.

Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. И. Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

INHIBITION AND CHANGE IN FRAGMENT METHYLATION BY 5-AZACYTIDINE

KIRNOS M. D., ALEXANDROVICH

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology, M. V. Lomonosov

It was found that after 3-hour incubation of cells with [2- ^{14}C]orotic acid in the presence of 5-azaC* (100 $\mu\text{g/ml}$) or S-isobutyl

идиловой и дезоксицитидиловой
о, для определения ССМ фраг-
С]метионином, нужно разделить
тримидиновые нуклеотиды рСр и
уклеотидный материал меченых
ей. Таким путем, однако, нель-
гментов, поскольку их распреде-
е почти совпадает с распределе-
которые включается метка из
постоянно осуществляемого в
кативного метилирования [6].
, содержащих фрагменты ДНК>
зованные, меченные по остаткам
е в репликацию, меченные только
ДНК. Поэтому ССМ лигирован-
ДНК, меченной [2-¹⁴С]оротовой
полипиримидиновые последова-
и и измеряли включенную в соб-
. В такой постановке опыта мы
овообразованных в присутствии
ров метилирования ЛРИ, а не

, 6], фрагменты Оказки сущест-
но ДНК (табл. 1) не только по
ания (распределению ³С по пи-
зо фрагментах Оказки пророст-
ируются цитозиновые остатки в
тедовательностях, а у лигирован-
едовательностях приходится толь-
но ДНК остатков ³С (табл. 1).
и на заметное (~30%-ное) инги-
анной в присутствии SIBA я ДНК
итрольных и опытных проростков
гельно, конкурентное ингибиро-
агментов в данном случае замет-

и 5-azaC небольшое «остаточное»
ки, так и линкерных зон реализу-
в относительно большей степени,
итно, это может объясняться тем,
тгов С на остатки 5-азацитозина
у моно- и полипиримидиновыми
о распределению в них остатков
ательно, по сравнению с монопи-
5-azaC-содержащие блоки будут
в гораздо большей степени. В ре-
«усиление» метилирования цито-
тельность.

илирования SIBA и 5-azaC здесь
еренцированного влияния на про-
отивного метилирования я ДНК в
и степень влияния этих ингибито-
тилирования я ДНК, как и собст-
ы. Это позволяет использовать
активных инструментов для более
ИК, клеточной дифференцировки и

UPA

biology and Immunology. Berlin; Heidel-
114.

2. Башките Е. А., Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И. и др. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 8. С. 1448—1456.
3. Кирнос М. Д., Кутуева Л. И., Ганичева Н. И., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 8. С. 1357—1366.
4. Кирнос М. Д., Ганичева Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 10. С. 1690—1702.
5. Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Кутуева Л. И. и др. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 4. С. 625—637.
6. Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 8. С. 1397—1406.
7. Kiryanov G. I., Kirnos M. D., Demidkina N. P. et al. // FEBS Letters. 1980. V. 112. № 2. P. 225—228.
8. Кирьянов Г. И., Исаева Л. В., Кирнос М. Д. и др. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 153—161.
9. Woodcock D. M., Adams J. K., Cooper I. A. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 696. № 1. P. 15—22.
10. Woodcock D. M., Crowther P. J., Simmons D. L., Cooper I. A. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 783. № 2. P. 227—233.
11. Bigler B., Bertaux O., Valencia R. // J. Cell Physiol. 1980. V. 103. № 2. P. 149—157.
12. Friedman S. // Molecular Pharmacology. 1981. V. 19. № 2. P. 314—320.
13. Jones P. A., Taylor S. M. // Nucleic Acids Res. 1981. V. 9. № 12. P. 2933—2947.
14. Creusot F., Acs G., Christman J. K. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 4. P. 2041—2048.
15. Taylor S. M., Jones P. A. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. P. 679—692.
16. Boucharde J., Mompalmer R. L. // Molecular Pharmacology. 1983. V. 24. P. 109—114.
17. Santi D. V., Norment A., Garrett C. E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6993—6997.
18. Венюжинский М. Т., Нестеренко В. Ф., Канопкайте С. И., Бурьянов Я. И. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 5. С. 749—754.
19. Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Кутуева Л. И., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 355—367.
20. Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 8. С. 1458—1474.
21. Кирнос М. Д., Волкова С. А., Ганичева Н. И. и др. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 10. С. 1587—1596.
22. Burton K., Petersen G. B. // Biochem. J. 1960. V. 75. P. 17—21.
23. Jackson D. A., McCready S. J., Cook P. R. // J. Cell Sci. 1984. V. 1. P. 51—79.
24. Краевский А. А., Куханова М. К. Репликация ДНК у эукариот. «Молекулярная биология». М.: ВИНТИ, 1986. Т. 22. 132 с.
25. Ашапкин В. В., Александрюшкина Н. И., Кирнос М. Д., Ванюшин Б. Ф. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 10. С. 1587—1594.
26. Vesely J., Cihak A. // Pharmac. Ther. 1978. V. 2. P. 813—840.
27. Jones P. A. DNA methylation. Biochemistry and biological significance. N. Y.; Berlin; Heidelberg; Tokyo: Springer-Verlag, 1985. P. 165—187.
28. Smith D. W., Garland A. M., Herman G. et al. // EMBO Journ. 1985. V. 4. № 5. P. 1319—1326.
29. Messer W., Bellehes U., Lothar U. // EMBO Journ. 1985. V. 4. № 5. P. 1327—1332.
30. Taylor J. H. DNA synthesis: present and future. N. Y.; L: Plenum Press, 1978. P. 143—159.
31. Кирнос М. Д., Артюховская Н. А., Александрюшкина Н. И. и др. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 11. С. 1875—1885.
32. Shafer D. A., Priest J. H. // Amer. J. Hum. Genet. 1984. V. 36. № 3. P. 534—545.
33. Gregory P., Greene C., Shapira E., Wang N. // Cytogenet. Cell Genet. 1985. V. 39. № 3. P. 234—236.
34. Schmidt M., Wolf S. F., Migeon B. R. // Exp. Cell Res. 1985. V. 158. P. 301—310.
35. Jablonka E., Goitein R., Sperling K. et al. // Chromosoma. 1987. V. 95. P. 81—88.
36. Артюховская Н. А., Александрюшкина Н. И., Ашапкин В. В. и др. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 11. С. 1868—1874.

Лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
12.VIII.1987

INHIBITION AND CHANGES IN THE SPECIFICITY OF OKAZAKI FRAGMENT METHYLATION IN WHEAT SHOOTS INDUCED BY 5-AZACYTIDINE OR S-ISOBUTYLADENOSINE

KIRNOS M. D., ALEKSANDRUSHKINA N. I., VANYUSHIN B. F.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University

It was found that after 3-hour incubation of cut-off etiolated wheat shoots (72 hours-
old) with [2-¹⁴С]orotic acid in the presence of DNA-methylation inhibitors, 5-azacytidine
(5-azaC*, 100 µg/ml) or S-isobutyladenosine (SIBA, 1.5 mM), the replicative synthesis

of labeled nuclear DNA in first leaf cells is inhibited by about 20%. In this case, the relative rates of the labeled pyrimidine precursor incorporation into newly synthesized nDNA (nsDNA) and the formation of ligated replicative intermediates (LRI) do not change significantly. SIBA practically completely blocks the postreplicative methylation of nsDNA and causes a ~30% inhibition of methylation of Okazaki fragments ($ML = 100 \cdot m^5C / (C + m^5C)$ decreases from 7.0—7.8 to 5.3) and LRI (ML decreases from 10.4 to 6.9). Under effects of 5-azaC, the replicative and postreplicative methylation of nDNA in first leaf cells is inhibited dramatically: the ML of newly synthesized Okazaki fragments and LRI is as low as 1.0 ± 0.2 . SIBA does not affect the specificity of methylation, i. e., m^5C distribution among pyrimidine isopaths in nsDNA, whereas in the presence of 5-azaC the relative amount of m^5C in nsDNA increases in alternating Pu-Py-Pu sequences from Okazaki fragments and LRI. Thus, under effects of SIBA and 5-azaC, the methylation of nDNA in wheat shoots appears to be markedly inhibited. In newly synthesized duplexes of nDNA, additional multiple undermethylated sites are formed; the specific organization of methylated sites in the replicating nuclear genome changes drastically under these conditions.

РЕЦЕПТОР КИНЕТИЧЕСКИ

В

Рассмотрены основные поведение рецепторов и механизмы передачи клеточного ответа. Обсуждаются детекторы, обеспечивающие сравнение эффективности взаимодействия. Рассмотрены и современные кинетические рецепторы. Обсуждаются химического сигнала в системе рецепторов к клеточной системе лиганд — рецептор. Даются механизмы «тушения» десенсилизации в рамках представлений о рецепторно-ферментной системе.

На молекулярном уровне осуществляется с помощью посредников рецепторно-ферментной информации и выбор «сигнала» белками — рецепторами. Моно, нейромедиатора, клеточного парата) с рецептором познания из потока возмущающих выступает в виде регуляторной ионканальной системы, обесценивающего сигнала. Через ферментную концентрационную (сАМР, ионы кальция, олигомеризация).

Практически все клетки и переработки информации в крови, прежде всего на уровне лиганд-рецепторного взаимодействия молекул представленных клеток централизованной переработки информации. Принципиально важными клеточным ответом являются белковыми специфическими тканями, интерлейкины, факторы, создание фундаментальных управления клеточной химической информации и рецепторно-ферментных систем. Поведение рецепторно-ферментной системы.

Рецепторы как селективные детекторы химического сигнала из хаотического высокоселективного сигнала.

Взаимодействие белков и биохимических явлений: ферментного взаимодействия. Изучение характеристик этих систем.